

PCT

WORLD ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/37, 15/62, C07K 14/025, A61K 39/12 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11272 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. April 1996 (18.04.96) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03974 | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Oktober 1995 (09.10.95) | | Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> | |
| (30) Prioritätsdaten: P 44 35 907.1 7. Oktober 1994 (07.10.94) DE 195 26 752.4 21. Juli 1995 (21.07.95) DE | | | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEDIGENE GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK, THERAPIE UND TECHNOLOGIE MBH [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE). | | | |
| (71)(72) Anmelder und Erfinder: GISSMANN, Lutz [DE/US]; 6340 Americana Drive No. 1201, Willowbrook, IL 60514 (US). ZHOU, Jian [AU/US]; 5931 Stewart Drive No. 1021, Willowbrook, IL 60514 (US). MÜLLER, Martin [DE/US]; 1351 North Hoyne, Chicago, IL 60622 (US). PAINSTIL, Jeanette [GH/US]; 1441 Evers Avenue, Westchester, IL 60154 (US). | | | |
| (74) Anwälte: DIEHL, Hermann, O., Th. usw.; Flüggenstrasse 13, D-80639 München (DE). | | | |
| (54) Title: PAPILLOMA VIRUS-LIKE PARTICLES, FUSION PROTEINS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME | | | |
| (54) Bezeichnung: PAPILLOMAVIRUSÄHNLICHE PARTIKEL, FUSIONSPROTEINE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG | | | |
| (57) Abstract | | | |
| Recombinant papilloma virus-like particles result from the expression of viral structural proteins L1 and/or L2 in which one or several sections of the L1 and/or L2 protein are deleted. The ability to form virus-like particles is at least the same as, preferably higher than, that of native reproduction and/or <i>in vitro</i> production processes. | | | |
| (57) Zusammenfassung | | | |
| Die Erfindung betrifft rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, in denen ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind und wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder <i>in vitro</i> Produktion zumindest bestehen bleibt, bevorzugt erhöht ist. | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Oesterreich | GA | Gabon | MR | Mauretanien |
| AU | Australien | GB | Vereinigtes Königreich | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GE | Georgien | NE | Niger |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BJ | Benin | IE | Irland | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BY | Belarus | JP | Japan | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KR | Republik Korea | SI | Slowenien |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kasachstan | SK | Slowakei |
| CM | Kamerun | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CN | China | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| ES | Spanien | MG | Madagaskar | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | ML | Mali | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MN | Mongolei | VN | Vietnam |

Papillomavirusähnliche Partikel, Fusionsproteine sowie
Verfahren zu deren Herstellung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, Proteine, Fusionsproteine 5 sowie Verfahren zur Bildung und Reinigung dieser Partikel, Proteine und Fusionsproteine.

Infektionen mit bestimmten ("high-risk") Typen von genitalen Papillomaviren des Menschen (HPV), z.B. HPV 16, 18 oder 45 10 gelten als hauptsächlicher Risikofaktor für die Entstehung von bösartigen Tumoren des Anogenitaltrakts, von denen Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) mit Abstand am häufigsten ist. Nach einer Schätzung der WHO treten jährlich weltweit etwa eine halbe Million neuer Fälle dieser 15 Erkrankung auf. Aufgrund dieser Häufung ist der Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Cervixcarcinom am besten untersucht:

- a) Vorläuferläsionen vom Cervixcarcinom (cervikale intraepitheliale Neoplasie: CIN) werden durch Papillomavirus-Infektion verursacht.
- b) Die Genome bestimmter HPV-Typen (z.B. 16,18,33,35,45) werden in mehr als 95 % der Tumorbiopsien sowie in davon abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen. Abhängig vom geographischen Ursprung der Tumore enthalten 50 - 70 % davon HPV 16.
- c) In allen daraufhin untersuchten Fällen werden die offenen Leseraster E6 und E7 transkribiert (Wettstein et al., in Pfister H. (ed): Papillomaviruses and human cancer, S. 30 155 bis 179, Boca Raton, 1990).
- d) Die Proteine E6 und E7 sind in allen Cervixcarcinom-Zelllinien sowie in *in vitro* transformierten menschlichen Keratinozyten nachweisbar und die Mehrzahl der 35

Cervixcarcinom-Patientinnen haben E6- bzw. E7-spezifische Antikörper.

e) Die konstitutive Expression der E6/E7-Proteine ist notwendig zur Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes HPV-positiver Tumore.

f) Die E6- und E7-Gene von HPV 16 und HPV 18 sind biologisch in folgenden experimentellen Systemen aktiv:

- Induktion von zellulärer DNA Synthese in menschlichen Zellen;
- Transformation von menschlichen Keratinozyten und anderen Zellen in Kultur;
- Tumorbildung in transgenen Mäusen.

Andere HPV-Typen (in erster Linie HPV 6 und 11) verursachen gutartige Genitalwarzen (condylomata acuminata) und sind nur extrem selten mit bösartigen Tumoren assoziiert ("low-risk" Typen).

Genitale Papillomaviren des Menschen werden in der Regel durch Geschlechtsverkehr übertragen und führen in den meisten Fällen zu einer persistierenden Infektion in der Anogenital-Schleimhaut. Daraus wurde geschlossen, daß Primärinfektionen nur eine ungenügende Immunantwort induzieren oder daß das Virus Möglichkeiten entwickelt hat, in den infizierten Zellen der Immunüberwachung zu entkommen. Auf der anderen Seite gibt es gute Hinweise darauf, daß das Immunsystem bei der Primärmanifestation bzw. bei der malignen Progression von Papillomavirus-Infektionen beteiligt ist (zur Übersicht siehe Altmann et al. (1994) in Minson A., Neil J., McCrae M. (eds): Viruses and Cancer, Cambridge University Press, S. 71 bis 80).

- 5 a) Bei animalen Papillomaviren (Kaninchen-Papillomavirus und Rinder-Papillomavirus) läßt sich die klinische Manifestation von Primärinfektionen durch Vakzinierung mit Virus-Strukturproteinen oder mit Warzenextrakten ("autologe Vakzine") verhindern.
- 10 b) Nager werden durch Impfung mit HPV 16 E6- oder E7-positiven Vaccinia-Rekombinanten bzw. durch synthetische Peptide vor der Tumorbildung nach Inokulation HPV 16 transformierter autologer Zellen geschützt.
- 15 c) Regression von Warzen ist oftmals systemisch und läßt sich bei animalen Papillomaviren durch Transfer von Lymphozyten von "Regressor"-Tieren induzieren.
- 20 d) Die Häufigkeit von Genitalwarzen, CIN und Anogenitalkrebs ist bei immunsupprimierten Patienten (z.B. Nierentransplantierten oder HIV-Infizierten) erhöht.
- 25 Daraus wurde geschlossen, daß Papillomavirus-spezifische Impfungen mit dem Ziel der Verhinderung der Primärinfektion und der Entstehung von Genitalkrebs möglich sein sollten.
- 30 1. Geeignet ist die Verhinderung von HPV-Infektionen durch Impfung mit den Papillomavirus-Strukturproteinen L1 und L2 (prophylaktische Impfung).
- 35 Da sich Papillomaviren nicht in Zellkultur oder anderen experimentellen Systemen zu ausreichenden Titern vermehren lassen, können die viralen Proteine nur mit Hilfe rekombinanter Vektoren hergestellt werden. Kürzlich wurden virusähnliche Partikel (VLP), die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und L2 (bzw. L1 allein) in rekombinanten Vakzina oder Baculovirus entstehen, beschrieben. Die Reinigung der VLP's ist sehr einfach

mittels Zentrifugation in CsCl- oder Sucrosegradienten durchführbar.

5 WO 93/02184 beschreibt eine Methode, die "Papilloma virus like particles" (VLP's, Papillomavirus-ähnliche Partikel) zur Verfügung stellt, die für diagnostische Verwendungen oder als Vaccine gegen durch den Papillomavirus verursachte Infektionen genutzt werden.

10 WO 94/00152 beschreibt ein rekombinant produziertes L1-Haupt-Capsid-Protein, welches die konformational neutralisierenden Epitope auf humanen und tierischen Papilloma-Virionen nachahmt (mimics). Diese rekombinanten Proteine sind als Vaccine, die gegen Papillomavirus-
15 Infektionen schützen, einsetzbar.

2. Behandlung von Cervixcarzinomen oder Vorläuferläsionen durch Immuntherapie mit Hilfe von frühen Papillomavirus-Proteinen (in erster Linie E6 bzw. E7), die in den
20 persistent infizierten Zellen exprimiert werden (therapeutische Impfung).

25 Es wird angenommen, daß durch diese Impfung zytotoxische T-Zellen gegen persistent infizierte Genitalläsionen aktiviert werden. Zielpopulation sind Patienten mit HPV-assozierten prämalignen oder malignen Genitalläsionen.

Frühe HPV-Proteine werden durch Expression in E. coli oder eukaryontischen Vektoren (z.B. Baculovirus oder Hefe) hergestellt. Die Reinigung wird jedoch durch die geringe Löslichkeit erschwert und bedarf in der Regel einer Kombination von Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie.
30

35 In der PCT-Anmeldung WO 93/20844 wird dargelegt, daß das E7-Protein des Papillomavirus aus HPV oder BPV

therapeutisch effektiv in der Regression (jedoch nicht in der Prävention) von Papillomavirus-Tumoren in Säugern ist. Weiterhin werden auch bevorzugte antigene Protein-Fragment-Sequenzen beschrieben.

5

10

Bisher wurden jedoch keine VPL's beschrieben, die sich sowohl für die prophylaktische als auch die therapeutische Impfung eignen. Nachteilig ist bei den zuletzt genannten Verfahren, daß z.B. frühe HPV-Proteine aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur erschwert gereinigt werden können.

15

15

Besonders wünschenswert, insbesondere im Hinblick auf einen Impfstoff für die prophylaktische und therapeutische Impfung wäre eine hohe Partikelproduktion.

20

Nachteilig war an dem bisher beschriebenen Verfahren, daß die Herstellung von VLPs nach Expression von L1 in E. coli nicht möglich war.

25

30

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, rekombinant hergestellte Proteine sowie VLP's zur Verfügung zu stellen, die sich als Impfstoff zur prophylaktischen und therapeutischen Impfung eignen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Proteine und VLP's. Ebenso soll eine einfache Reinigung der erhaltenen rekombinanten Proteine ermöglicht sein. Auch sollte eine Herstellung von VLPs nach Expression von L1 in E. coli ermöglicht sein.

35

35

Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe gemäß den in den unabhängigen Ansprüchen 1 und 12 angegebenen VLPs, den im unabhängigen Anspruch 36 angegebenen Proteinen, den in den unabhängigen Ansprüchen 8 und 38 angegebenen Fusionsproteinen, den in den Ansprüchen 42 und 43 angegebenen Verfahren, und der Verwendung nach den

Ansprüchen 55 und 56. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen, Aspekte und Details der Erfindung sind in den abhängigen Patentansprüchen der Beschreibung sowie den bevorzugten Ausführungsformen dargelegt.

5

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden VLP's hergestellt, die aus Fusionsproteinen von späten und frühen HPV-Proteinen (oder Fragmenten davon) ("HVLP") bestehen und für prophylaktische bzw. therapeutische Impfung einsetzbar sind. Ein solcher Impfstoff besitzt gegenüber konventionellen Präparaten die im folgenden beschriebenen Vorteile:

- a) Im Falle von prophylaktischer Impfung verhindern HVLP's durch Induktion L1/L2-spezifischer Antikörper nicht nur den Eintritt des Virus in die Zelle, sondern eliminieren bereits infizierte Zellen (durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen), falls schon früher eine Infektion stattgefunden hat oder die humorale Immunantwort nicht ausreichend war.
- b) Im Falle von therapeutischer Impfung eliminieren HVLP's persistent infizierte Zellen (z.B. bei Patienten mit CIN oder Cervixcarcinom), und verhindern vor allem bei Patientinnen mit CIN-Läsionen eine Reinfektion.
- c) Die Reinigung der HVLP's ist ähnlich einfach wie die der VLP's ohne frühe HPV-Proteine.

30

Gemäß der vorliegenden Erfindung können VLP's des Bovinen Papillomavirus (BPV) Typ 1 und der humanen Papillomaviren 11 und 16 nach Expression von L1 plus L2 bzw. von L1 allein in Vaccinia oder Baculovirus hergestellt werden. Experimente zeigen, daß Teile des L1-Proteins deletiert werden können (Aminosäuresequenz 311-351, 331-371, 391-431 von BPV 1; 306-

315 von HPV 16), ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP's verloren geht. Solche Bereiche existieren in den L1-Proteinen aller Papillomaviren, so daß der deletierte Bereich von L1 durch andere Proteine (von Papillomaviren oder von anderem Ursprung) ersetzt werden kann und daß so virusähnliche Hybridpartikel hergestellt werden können. In gleicher Weise werden auch Teile des Papillomavirus-Proteins L2 deletiert und durch andere (frühe HPV oder sonstige) Proteine ersetzt, daß also HPLV's auch aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein gebildet werden können.

Fusionsproteine, bestehend aus deletiertem L1- oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (in erster Linie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) und den entsprechenden frühen Proteinen E1, E2, E4, E5, E6, E7 (oder Teilen davon) werden durch Expression in Vaccinia-Rekombinannten hergestellt, die in sehr kurzer Zeit konstruiert werden können. Die Bildung von VLP's, bestehend entweder aus einem L1-Fusionsprotein oder aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein, wird durch Elektronenmikroskopie überprüft und das Vorhandensein des frühen HPV-Proteins durch Western Blot Analyse mit Hilfe spezifischer Antiseren getestet. Für die Produktion von HPLV's im großen Maßstab wird die Expression der Proteine in viralen oder eukaryotischen Systemen, bevorzugt in Baculovirus oder in Hefe, durchgeführt.

Entsprechende Experimente zur Herstellung von Fusionsproteinen können mit Proteinen anderen Ursprungs durchgeführt werden.

Wesentlich für die vorliegende Erfindung sind rekombinant hergestellte, virusähnliche Partikel (virus like particles, VLP's), die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, wobei Abschnitte des L1- und/oder L2-

Proteins deletiert sind, ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP's verlorengeht.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem
5 deletierten Bereich im L1-Protein des Bovinen Papillomavirus Typ 1 bevorzugt um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431. Bei L1-Proteinen des humanen Papillomavirus 16 handelt es sich vorteilhafterweise um die Aminosäuresequenz 306-315.

10

In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung wird der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt, wobei Fusionsproteine erhalten werden. Der Anteil an L1- bzw. L2-
15 Protein beträgt vorteilhafterweise ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 %.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sollen jedoch, wenn auch im weiteren nicht explizit erwähnt, auch mehr als ein Bereich,
20 des L1- und/oder L2-Proteins deletiert und bevorzugt durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt werden.

Besonders bevorzugt wird der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder
25 Proteine anderen Ursprungs ersetzt, wodurch virusähnliche Hybridpartikel (HVLP's) herstellbar sind.

Es hat sich als besonders vorteilhaft gemäß der vorliegenden Erfindung erwiesen, daß die Bildung der VLP's aus einem L1-Fusionsprotein oder, gemäß einer weiteren Ausführungsform, aus einem vollständigen L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

Die Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von
35 virusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, bestehen

vorteilhafterweise aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (human papilloma virus), besonders bevorzugt HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35 und 45, und anderen Proteinen oder Proteinfragmenten. Bevorzugt handelt 5 es sich bei diesen anderen Proteinen oder Proteinfragmenten um entsprechende frühe Proteine oder Fragmente davon, wie z.B. die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und/oder E7.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Expression der 10 Fusionsproteine und Proteine in viralen oder eukaryotischen Vektoren, ganz besonders bevorzugt in Baculoviren oder in Hefen, durchgeführt.

Gemäß einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen 15 Verfahrens werden die Fusionsproteine durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt.

Die Anwendung der Fusionsproteine oder der virusähnlichen 20 Hybridpartikel zur Herstellung eines prophylaktischen und therapeutischen Impfstoffes erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

Bislang wurde zur Herstellung von VLPs, wie z.B. von VLPs aus 25 HPV 16, das L1 offene Leseraster (ORF) mit Hilfe eukaryontischer Vektoren, wie z.B. Bakulovirus, exprimiert. Die Bildung der VLPs (Assembly) erfolgt im Zellkern der infizierten Zellen.

Wesentlich für die vorliegende Erfindung sind deshalb 30 insbesondere rekombinant hergestellte, papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, in denen ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die 35 Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder in vitro Produktion erhöht ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um eine Deletion, vorteilhafterweise in der C-terminalen Aminosäuresequenz, bevorzugt in einer Länge von ungefähr 1 bis 34 Aminosäuren (AS), bevorzugt von 1 bis 26 Aminosäuren (AS), insbesondere von 26 AS.

10 Vorteilhafterweise wird nach Einfügen der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLPs um ein Vielfaches erhöht, bevorzugt um das mindestens 10-fache, und insbesondere um das ungefähr 10- bis 100-fache.

15 In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein, insbesondere des Bovinen Papillomavirus, um 26 C-terminalen Aminosäuren. Besonders bevorzugt ist die 26 AS große, C-terminalen Deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-
20 Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys) entsprechend der Nucleotid-Position 7016 bis 7093 GGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAA AAAAAAAA in das L1 ORF des Bovinen Papillomavirus Typ 1 (BPV 1) eingefügt. Vorteilhafterweise
25 ist nach Einfügen der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLP's um das mindestens 10-fache gesteigert.

30 Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der mindestens einen Deletion im L1- und/oder L2-Protein um eine homologe Aminosäuresequenz des humanen Papillomavirus 16 oder anderer Papillomaviren.

35 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung handelt es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 34 C-terminalen Aminosäuren des Humanen Papillomavirus

Typ 16 (HPV 16), bevorzugt um die AS-Sequenz Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) entsprechend der Nucleotid-Position 7052 bis 7153 GCAGGATTGA
5 AGGCCAAACC AAAATTTACA TTAGGAAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACCA
TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG, welche in das L1 ORF des HPV 16 eingefügt ist.

Besonders bevorzugt umfaßt die Deletion des L1- und/oder L2-
10 Proteins das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Die Partikelproduktion aus den L1-Proteinen oder den L1-Proteinen und L2-Proteinen erfolgt insbesondere im Zytoplasma. Bevorzugt werden die Partikel in den Überstand sezerniert, besonders bevorzugt ist eine Sekretion von ungefähr 5 bis 10
15 % der Partikel.

Die Expression von L1-Proteinen oder L1-Proteinen und L2-Proteinen in E. coli erfolgt gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform. Hierbei sind an der C-terminalen Deletion im
20 L1-Protein insbesondere zusätzlich 6 Histidine eingefügt. Vorteilhaft erweist sich die Herstellung von VLP's nach Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli.

25 Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein des Bovinen Papillomavirus Typ 1 bevorzugt um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431. Bei L1-Proteinen des humanen Papillomavirus 16 handelt es sich vorteilhaft erweist um die
30 Aminosäuresequenz 306-315.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung wird der weitere deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt, wobei Proteine erhalten werden, die im weiteren als Fusionsproteine bezeichnet werden. Der Anteil an L1- bzw. L2-

Protein beträgt vorteilhafterweise ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 %.

5 Gemäß der vorliegenden Erfindung sollen jedoch, wenn auch im weiteren nicht explizit erwähnt, auch mehr als ein weiterer Bereich des L1- und/oder L2-Proteins deletiert und bevorzugt durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt werden.

10 Besonders bevorzugt wird der deletierte Bereich von L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteine anderen Ursprungs ersetzt, wodurch virusähnliche Hybridpartikel (HVLP's) herstellbar sind.

15 Es hat sich als besonders vorteilhaft gemäß der vorliegenden Erfindung erwiesen, daß die Bildung der VLP's aus einem L1-Protein, einem L1-Fusionsprotein, einem L1-Protein und L2-Protein, einem L1-Fusionsprotein und L2-Protein, einem L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein oder einem L1-Fusionsprotein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

20 Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um N-terminale Aminosäuresequenzen.

25 Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei einer weiteren Ausführungsform bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1-Protein und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um Aminosäuresequenzen im mittleren Bereich des Proteins.

30 Wesentlich für die Erfindung sind ebenfalls Proteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln, wobei ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind. Insbesondere handelt es

sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein um eine Deletion einer C-terminalen Aminosäuresequenz.

5 Die Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, bestehen vorteilhafterweise aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen Papillomaviren, besonders bevorzugt
10 HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 und 45, und anderen Proteinen oder Proteinfragmenten von Papillomaviren oder von anderer Herkunft. Bevorzugt handelt es sich bei diesen anderen Proteinen oder Proteinfragmenten um entsprechende frühe Papillomavirus-Proteine oder Fragmente davon, wie z.B. die
15 frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und/oder E7.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird zur Expression der Proteine und/oder Fusionsproteine und Produktion von papillomavirusähnlichen Partikeln in viralen, eukaryotischen
20 oder prokaryotischen Vektoren, ganz besonders bevorzugt in Vaccinia-Rekombinanten, in Baculoviren, in Hefen oder in Bakterien, insbesondere in *E. coli*, durchgeführt.

Bevorzugt erfolgt die Partikelproduktion im Zytoplasma. Die
25 Partikel werden besonders bevorzugt in den Überstand sezerniert, ganz besonders bevorzugt werden ungefähr 5 bis 10 % der Partikel in den Überstand sezerniert.

Insbesondere wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch
30 Einfügen einer 26 Aminosäure (AS) großen, C-terminalen Deletion in der Nucleotidposition 7016-7093 in das L1 ORF des bovinen Papillomavirus Typ 1 (BPV 1) die Produktion von VLPs um das mehr als 10-fache gesteigert. So lässt sich bei gleicher Menge an L1-Protein, wie z.B. in einem Western Blot
35 demonstrierbar, eine Steigerung der Partikelzahl im Elektronenmikroskop zeigen. Da die Deletion bevorzugt das

nukleäre Lokisationssignal (NLS) umfaßt, erfolgt die Partikelproduktion im Zytoplasma, ein erheblicher Teil der Partikel wird in den Überstand sezerniert. Dies ist besonders vorteilhaft, da hierdurch die Reinigung wesentlich erleichtert wird.

Proteine, bevorzugt mit genannter Deletion mit zusätzlichen 6 Histidinen (His-L1-Proteine) werden gemäß der vorliegenden Erfindung in *E. coli* exprimiert. Die Proteine, insbesondere His-L1-Proteine, werden bevorzugt über Ni-Affinitätschromatographie gereinigt, wobei die Proteine entsprechend einer vorteilhaften Ausführungsform zu diesem Zeitpunkt in Denaturierungspuffer, beispielsweise 6 M Guanidinhydrochlorid, vorliegen. Die Renaturierung erfolgt beispielsweise in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % Triton-X 100, 10 mM Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure), pH 7,4.

Die Produktion (Assembly) der VLP erfolgt gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung nach Dialyse der Proteine, vorteilhafterweise nach Dialyse gegen 150 mM NaCl, 25 mM Ca²⁺, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 0,1 % Triton-X 100, 10 mM Tris [tris-(hydroxymethyl)aminomethan] Essigsäure bei einem pH-Wert von 5,0.

Die Deletion von Sequenzen im L1-Protein von sämtlichen Papillomaviren, die das vorzeitige Assembly der VLPs verhindern, führt zu einer höheren Ausbeute bei der VLP Produktion.

Sofern in diesen Fällen das L1 NLS betroffen ist, erfolgt die Assembly im Zytoplasma. Somit ist die Reinigung des VLPs erfindungsgemäß aus dem Zytoplasma, statt wie bisher aus dem Zellkern, möglich. Erfindungsgemäß sind auch kürzere Deletionen möglich. Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Deletionen bis zu einer Aminosäure und/oder Substitutionen

von bis zu einer Aminosäure durchgeführt. Hierbei erweist es sich als vorteilhaft, daß bei kurzen Deletionen bzw. bei Substitutionen von bis zu einer bzw. nur weniger Aminosäuren die antigenen Eigenschaften der Proteine und der sich daraus gebildeten VLPs so wenig wie möglich gegenüber der nativen antigenen Eigenschaft der Proteine bzw. VLPs verändert sind.

Die Einführung einer wie vorgehend ausgeführten C-terminalen Deletion bzw. Substitution in L1- und/oder L2-Fusionsproteine, führt auch zu einer Steigerung der Produktion von Hybrid VLPs. Hierbei sollen auch die VLPs eingeschlossen sein, die nur L1-Fusionsproteine enthalten, sowie Hybrid VLPs, die ein L1- bzw. L2-Fusionsprotein und ein L2- bzw. L1-Protein enthalten.

Hierzu werden VLP's hergestellt, die aus Fusionsproteinen von späten und frühen HPV-Proteinen (oder Fragmenten davon) ("HVLP") bestehen und für prophylaktische bzw. therapeutische Impfung einsetzbar sind. Ein solcher Impfstoff besitzt gegenüber konventionellen Präparaten die im folgenden beschriebenen Vorteile:

- a) Im Falle von prophylaktischer Impfung verhindern HVLP's durch Induktion L1/L2-spezifischer Antikörper nicht nur den Eintritt des Virus in die Zelle, sondern eliminieren bereits infizierte Zellen (durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen), falls schon früher eine Infektion stattgefunden hat oder die humorale Immunantwort nicht ausreichend war.
- b) Im Falle von therapeutischer Impfung eliminieren HVLP's persistent infizierte Zellen (z.B. bei Patienten mit CIN oder Cervixcarcinom), und verhindern vor allem bei Patientinnen mit CIN-Läsionen eine Reinfektion.

c) Die Reinigung der HVLP's ist ähnlich einfach wie die der VLP's ohne frühe HPV-Proteine.

VLP's des Bovinen Papillomavirus (BPV) Typ 1 und der humanen Papillomaviren 11 und 16 können nach Expression von L1 plus L2 bzw. von L1 allein in Vaccinia oder Baculovirus hergestellt werden. Experimente zeigen, daß Teile des L1-Proteins deletiert werden können (Aminosäuresequenz 311-351, 331-371, 391-431 von BPV 1; 306-315 von HPV 16), ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLP's verloren geht. Solche Bereiche existieren in den L1-Proteinen aller Papillomaviren, so daß der deletierte Bereich von L1 durch andere Proteine (von Papillomaviren oder von anderem Ursprung) ersetzt werden kann und daß so virusähnliche Hybridpartikel hergestellt werden können. In gleicher Weise werden auch Teile des Papillomavirus-Proteins L2 deletiert und durch andere (frühe HPV oder sonstige) Proteine ersetzt, daß also HVLP's auch aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein gebildet werden können.

20

Fusionsproteine bestehend aus deletiertem L1- oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen (in erster Linie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45) und den entsprechenden frühen Proteinen E1, E2, E4, E5, E6, E7 (oder Teilen davon) werden durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt, die in sehr kurzer Zeit konstruiert werden können. Die Bildung von VLPs, bestehend entweder aus einem L1-Fusionsprotein oder aus dem vollständigen L1-Protein plus einem L2-Fusionsprotein, wird durch Elektronenmikroskopie überprüft und das Vorhandensein des frühen HPV-Proteins durch Western Blot Analyse mit Hilfe spezifischer Antiseren getestet. Für die Produktion von HPLV's im großen Maßstab wird die Expression der Proteine in viralen eukaryotischen oder prokaryotischen Systemen, bevorzugt in Baculovirus, in Hefe, oder in E. coli durchgeführt.

Die Anwendung der Fusionsproteine oder der virusähnlichen Hybridpartikel zur Herstellung eines prophylaktischen und therapeutischen Impfstoffs erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

5

Entsprechende Experimente zur Herstellung von Fusionsproteinen können mit Proteinen anderen Ursprungs durchgeführt werden.

Patentansprüche

1. Rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln bestehen bleibt.
- 10 2. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431 des Bovinen Papillomavirus Typ 1 handelt.
- 15 3. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenz 306-315 des humanen Papillomavirus 16 handelt.
- 20 4. Virusähnliche Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt ist, um ein Fusionsprotein zu erhalten.
- 25 5. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an L1- bzw. L2-Protein ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 % des Fusionsproteins beträgt.
- 30 6. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteinen anderen Ursprungs

ersetzt ist, wodurch virusähnliche Hybridpartikel herstellbar sind.

7. Virusähnliche Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der virusähnlichen Partikel aus einem L1-Fusionsprotein oder einem vollständigen L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.

10 8. Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine aus einem deletierten L1- und/oder L2-Protein von verschiedenen HPV-Typen und anderen Proteinen oder Fragmenten davon umfassen.

15 9. Fusionsprotein nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die anderen Proteine oder Fragmente frühe Proteine oder Fragmente sind.

20 10. Fusionsprotein nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 oder um Fragmente davon handelt.

25 11. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen HPV-Typen wie HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 handelt.

30 12. Rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen,

35 dadurch gekennzeichnet,

daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind, wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder in vitro Produktion erhöht ist.

5

13. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um C-terminale Aminosäuresequenzen handelt.

10

14. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem mindestens einen deletierten Abschnitt im C-terminalen Bereich im L1- und/oder L2-Protein um eine Aminosäuresequenz in einer Länge von ungefähr 1 bis 34 Aminosäuren, bevorzugt 1 bis 26 Aminosäuren, eines Papillomavirus handelt.

20

15. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß nach Einfügen insbesondere der C-terminalen Deletion in das L1- und/oder L2-Protein die Produktion von VLPs um ein Vielfaches, bevorzugt um das mindestens 10-fache, besonders bevorzugt um das ca. 10- bis 100-fache, gesteigert wird.

25

16. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 26 C-terminale Aminosäuren des Bovinen Papillomavirus handelt.

30

35

17. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die 26 AS große, C-terminale

5 Deletion (Gly-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-Val-Arg-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys) entsprechend der Nucleotid-Position 7016 bis 7093 GGGGCAGGAT GTTCAACTGT GAGAAAACGA AGAATTAGCC AAAAAAACTTC CAGTAAGCCT GCAAAAAAAAA AAAAAAAA, in das L1 ORF des Bovinen Papillomavirus Typ 1 eingefügt ist.

10 18. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den deletierten Bereichen im L1- und/oder L2-Protein um 15 34 C-terminale Aminosäuren des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV 16) handelt.

15 19. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 18, dadurch 20 gekennzeichnet, daß die 34 AS große, C-terminale Deletion (Ala-Gly-Leu-Lys-Ala-Lys-Pro-Lys-Phe-Thr-Leu-Gly-Lys-Arg-Lys-Ala-Thr-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Thr-Thr-Ala-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu) entsprechend der Nucleotid-Position 7052 bis 7153 GCAGGATTGA AGGCCAACCG AAAATTTACA TTAGGAAAC GAAAAGCTAC ACCCACCACCA TCATCTACCT CTACAACTGC TAAACGCAAA AAACGTAAGC TG in das L1 ORF des Humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV 16) eingefügt ist.

25 20. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der mindestens einen Deletion im C-terminalen Bereich im L1- und/oder L2-Protein um eine homologe Aminosäuresequenz des humanen Papillomavirus 16 oder anderer Papillomaviren handelt.

30 21. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Deletion des L1- und/oder L2-Proteins das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) umfaßt.

22. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelproduktion aus den L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen im Zytoplasma erfolgt.
- 5 23. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß Partikel in den Überstand sezerniert werden.
- 10 24. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 5 bis 10 % der Partikel in den Überstand sezerniert werden.
- 15 25. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli erfolgt.
- 20 26. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß an der C-terminalen Deletion im L1 Protein 6 Histidine eingefügt wurden.
- 25 27. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 25 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung von VLPs nach Expression von L1-Proteinen oder L1- und L2-Proteinen in E. coli erfolgt.
- 30 28. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein um die Aminosäuresequenzen 311-351, 331-371, 391-431 des Bovinen Papillomavirus Typ 1 handelt.
- 35 29. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den weiteren deletierten Bereichen im L1-Protein um die

Aminosäuresequenz 306-315 des humanen Papillomavirus 16 handelt.

30. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich von L1- und/oder L2-Proteinen durch andere Proteine oder Proteinfragmente ersetzt ist, um ein Fusionsprotein zu erhalten.
- 5 31. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an L1- bzw. L2-Protein ca. 50 bis 99 %, bevorzugt ca. 60 bis 90 %, besonders bevorzugt ca. 80 % des Fusionsproteins beträgt.
- 10 32. Virusähnliche Partikel nach Anspruch 30 und 31, dadurch gekennzeichnet, daß der deletierte Bereich im L1- oder L2-Protein durch andere Proteine von Papillomaviren und/oder Proteinen anderen Ursprungs ersetzt ist, wodurch virusähnliche Hybridpartikel herstellbar sind.
- 15 33. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung der virusähnlichen Partikel aus einem L1-Protein, einem L1-Fusionsprotein, einem L1-Protein und L2-Protein, einem L1-Fusionsprotein und L2-Protein, einem L1-Protein und einem L2-Fusionsprotein oder einem L1-Fusionsprotein und einem L2-Fusionsprotein erfolgt.
- 20 34. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um N-terminale Aminosäuresequenzen handelt.
- 25
- 30
- 35

35. Virusähnliche Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein eines Papillomavirus um Aminosäuresequenzen im mittleren Bereich des Proteins handelt.
- 5
36. Proteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln gemäß einem der Ansprüche 12 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind.
- 10
37. Proteine nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei mindestens einem der deletierten Bereiche im L1- und/oder L2-Protein um eine Deletion einer C-terminalen Aminosäuresequenz handelt.
- 15
38. Fusionsproteine, insbesondere zur Bildung von papillomavirusähnlichen Hybridpartikeln nach einem der Ansprüche 12 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen Papillomaviren und andere Proteine oder Fragmente von Papillomaviren oder anderer Herkunft enthalten.
- 20
39. Fusionsprotein nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die anderen Proteine oder Fragmente frühe Papillomavirus-Proteine oder Fragmente davon sind.
- 25
40. Fusionsprotein nach Anspruch 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um die frühen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 oder um Fragmente davon handelt.
- 30
- 35

41. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 38 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um deletierte L1- und/oder L2-Proteine von verschiedenen HPV-Typen wie HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 handelt.

5

42. Verfahren zur Expression der Fusionsproteine gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in viralen oder in eukaryotischen Vektoren durchgeführt wird.

10

43. Verfahren zur Expression der Proteine und/oder Fusionsproteine und Produktion von papillomavirusähnlichen Partikeln gemäß einem der Ansprüche 12 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in viralen, eukaryotischen oder prokaryotischen Vektoren durchgeführt wird.

15

20 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine oder Fusionsproteine durch Expression in Vaccinia-Rekombinanten hergestellt werden.

25

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in Baculoviren oder in Hefen durchgeführt wird.

30

46. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Proteine und Fusionsproteine in E. coli durchgeführt wird.

35

47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung, insbesondere der L1-Proteine, durch Ni-Affinitätschromatographie und Renaturierung,

bevorzugt in 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,01 % Triton-X 100, 10 mM Hepes pH 7,4, erfolgt.

48. Verfahren nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine zum Zeitpunkt der Reinigung in Denaturierungspuffer vorliegen.
5
49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Denaturierungspuffer um 6 M Guanidinhydrochlorid handelt.
10
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß das Assembly der VLPs nach Dialyse erfolgt.
15
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die Dialyse gegen 150 mM NaCl, 25 mM Ca²⁺, 10% DMSO, 0,1% Triton-X 100 und 10 mM Tris Essigsäure bei pH = 5,0 erfolgt.
20
52. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 51, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelproduktion im Zytosplasma erfolgt.
25
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 43 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß Partikel in den Überstand sezerniert werden.
30
54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß ungefähr 5 bis 10% der Partikel in den Überstand sezerniert werden.
35
55. Verwendung der Proteine und/oder Fusionsproteine gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11 oder 36 bis 41 zur Herstellung eines Impfstoffs zur prophylaktischen

und/oder therapeutischen Impfung, bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

56. Verwendung der virusähnlichen Hybridpartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 12 bis 35 zur Herstellung eines Impfstoffs zur prophylaktischen und/oder therapeutischen Impfung, bevorzugt nach Zugabe weiterer Komponenten.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



WELTOrganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C07K 14/025, 19/00, C12N 15/12,
A61K 39/12

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11272

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

18. April 1996 (18.04.96)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP95/03974

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Oktober 1995 (09.10.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 35 907.1
195 26 752.4

7. Oktober 1994 (07.10.94)
21. Juli 1995 (21.07.95)

DE
DE

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, MX, US, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-
berichts: 26. September 1996 (26.09.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEDIGENE GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK, THERAPIE UND TECHNOLOGIE MBH [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE).

(71)(72) Anmelder und Erfinder: GISSMANN, Lutz [DE/US]; 6340 Americana Drive No. 1201, Willowbrook, IL 60514 (US). ZHOU, Jian [AU/US]; 5931 Stewart Drive No. 1021, Willowbrook, IL 60514 (US). MÜLLER, Martin [DE/US]; 1351 North Hoyne, Chicago, IL 60622 (US). PAINSTIL, Jeanette [GH/US]; 1441 Evers Avenue, Westchester, IL 60154 (US).

(74) Anwälte: DIEHL, Hermann, O., Th. usw.; Flüggenstrasse 13, D-80639 München (DE).

(54) Title: PAPILLOMA VIRUS-LIKE PARTICLES, FUSION PROTEINS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: PAPILLOMAVIRUSÄHNLICHE PARTIKEL, FUSIONSPROTEINE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract

Recombinant papilloma virus-like particles result from the expression of viral structural proteins L1 and/or L2 in which one or several sections of the L1 and/or L2 protein are deleted. The ability to form virus-like particles is at least the same as, preferably higher than, that of native reproduction and/or *in vitro* production processes.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft rekombinant hergestellte papillomavirusähnliche Partikel, die nach Expression der viralen Strukturproteine L1 und/oder L2 entstehen, in denen ein oder mehrere Abschnitte des L1- und/oder L2-Proteins deletiert sind und wobei die Fähigkeit zur Bildung von virusähnlichen Partikeln im Vergleich zur nativen Bildung und/oder *in vitro* Produktion zumindest bestehen bleibt, bevorzugt erhöht ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Oesterreich | GA | Gabon | MR | Mauretanien |
| AU | Australien | GB | Vereinigtes Königreich | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GE | Georgien | NE | Niger |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BJ | Benin | IE | Irland | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BY | Belarus | JP | Japan | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KR | Republik Korea | SI | Slowenien |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kasachstan | SK | Slowakei |
| CM | Kamerun | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CN | China | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| ES | Spanien | MG | Madagaskar | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | ML | Mali | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MN | Mongolei | VN | Vietnam |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
/EP 95/03974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/025 C07K19/00 C12N15/12 A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------------|
| X | VIROLOGY, vol. 194, 1993, pages 210-218, XP002001752 ZHOU J. ET AL.: "Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein" see the whole document --- | 1,12,33, 34,36 |
| Y | WO,A,94 20137 (UNIV ROCHESTER) 15 September 1994 see page 5, line 27 - page 6, line 25; claims 30-40 --- | 55,56 |
| Y | --- | 1,12,33, 34,36, 55,56 |
| | -/- | |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *'&' document member of the same patent family

3

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 7 August 1996 | 14.08.96 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 | Authorized officer Gurdjian, D |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03974

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|--------------------------------------|
| Y | VIROLOGY, vol. 170, 1989, pages 321-325, XP002001755 NASSERI M. ET AL.: "Genetic analysis of crpv pathogenesis : the open reading frame is dispensable for cellular transformation but is required for Pailloma formation" see the whole document --- | 1,12,33, 34,36, 55,56 |
| A | VIROLOGY, vol. 178, 1990, pages 238-246, XP002001753 CRUM C.P. ET AL.: "Coexpression of the human papillomavirus type 16 e4 and 11 open reading frames in early cervical neoplasia" see the whole document --- | 4-11, 38-54 |
| A | WO,A,93 00436 (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7 January 1993 see page 4, paragraph 3; claims 1,8,10 --- | 4-11, 38-54 |
| A | VIROLOGY, vol. 185, 1991, pages 625-632, XP002001754 ZHOU J. ET AL.: "Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 11 protein" see the whole document --- | 21-24 |
| A | WO,A,93 02184 (UNIV QUEENSLAND ;CLS LIMITED (AU)) 4 February 1993 cited in the application see page 19, line 8 - line 22 see page 32, line 23 - page 33, line 22; claims 1-33; table 1 --- | 1-16,33, 36-56 |
| A | EP,A,0 565 794 (BRITISH BIO TECHNOLOGY) 20 October 1993 see example 16 ----- | 1,4-16, 18, 20-25, 27,30-56 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP95/03974

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

For the different inventions please see the supplementary sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP95/03974

1. **Claims 1-56 in part:** papilloma virus-like particles with deleted L1 and without deleted L2 particles, their proteins, fusion proteins and process for forming and purifying these particles, proteins and fusion proteins.
2. **Claims 1, 4-16, 18, 20-25, 27, 30-56 in part:** papilloma virus-like particles with deleted L2 and without deleted L1 particles, their proteins, fusion proteins and process for forming and purifying these particles, proteins and fusion proteins.
3. **Claims 1-56 in part:** papilloma virus-like particles with deleted L1 and deleted L2 particles, their proteins, fusion proteins and process for forming and purifying these particles, proteins and fusion proteins.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In tional Application No

EP 95/03974

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------|------------------|
| WO-A-9420137 | 15-09-94 | AU-B- | 6443694 | 26-09-94 |
| | | EP-A- | 0688227 | 27-12-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9300436 | 07-01-93 | AU-B- | 662910 | 21-09-95 |
| | | AU-B- | 1985992 | 25-01-93 |
| | | EP-A- | 0592480 | 20-04-94 |
| | | JP-T- | 6508988 | 13-10-94 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9302184 | 04-02-93 | AU-B- | 651727 | 28-07-94 |
| | | EP-A- | 0595935 | 11-05-94 |
| | | JP-T- | 7505042 | 08-06-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EP-A-0565794 | 20-10-93 | AU-B- | 2462392 | 18-11-93 |
| | | AU-B- | 4076393 | 18-11-93 |
| | | WO-A- | 9320840 | 28-10-93 |
| | | WO-A- | 9321332 | 28-10-93 |
| | | JP-T- | 7505412 | 15-06-95 |
| | | NZ-A- | 244126 | 22-12-94 |
| | | ZA-A- | 9206340 | 21-02-94 |
| | | ZA-A- | 9302624 | 25-10-93 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03974

| | | | | |
|--|------------|-----------|-----------|-----------|
| A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES | | | | |
| IPK 6 | C07K14/025 | C07K19/00 | C12N15/12 | A61K39/12 |

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|---------------------------------|
| X | VIROLOGY, Bd. 194, 1993, Seiten 210-218, XP002001752 ZHOU J. ET AL.: "Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein" siehe das ganze Dokument --- | 1, 12, 33, 34, 36 |
| Y | WO,A,94 20137 (UNIV ROCHESTER) 15.September 1994 siehe Seite 5, Zeile 27 - Seite 6, Zeile 25; Ansprüche 30-40 --- | 55, 56 |
| Y | --- | 1, 12, 33, 34, 36, 55, 56 |
| | | -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- " T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- " X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- " Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundenischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- " &" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3

| | |
|--|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 7.August 1996 | 14.08.96 |
| Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Gurdjian, D |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

EP 95/03974

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------------------------|
| Y | VIROLOGY, Bd. 170, 1989, Seiten 321-325, XP002001755 NASSERI M. ET AL.: "Genetic analysis of crpv pathogenesis : the open reading frame is dispensable for cellular transformation but is required for Pailloma formation" siehe das ganze Dokument --- | 1,12,33, 34,36, 55,56 |
| A | VIROLOGY, Bd. 178, 1990, Seiten 238-246, XP002001753 CRUM C.P. ET AL.: "Coexpression of the human papillomavirus type 16 e4 and l1 open reading frames in early cervical neoplasia" siehe das ganze Dokument --- | 4-11, 38-54 |
| A | WO,A,93 00436 (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7.Januar 1993 siehe Seite 4, Absatz 3; Ansprüche 1,8,10 --- | 4-11, 38-54 |
| A | VIROLOGY, Bd. 185, 1991, Seiten 625-632, XP002001754 ZHOU J. ET AL.: "Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 l1 protein" siehe das ganze Dokument --- | 21-24 |
| A | WO,A,93 02184 (UNIV QUEENSLAND ;CLS LIMITED (AU)) 4.Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 19, Zeile 8 - Zeile 22 siehe Seite 32, Zeile 23 - Seite 33, Zeile 22; Ansprüche 1-33; Tabelle 1 --- | 1-16,33, 36-56 |
| A | EP,A,0 565 794 (BRITISH BIO TECHNOLOGY) 20.Okttober 1993 siehe Beispiel 16 ----- | 1,4-16, 18, 20-25, 27,30-56 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03974

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhangige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Bitte entnehmen Sie die verschiedenen Erfindungen dem Fortsetzungsblatt!

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP95/03974

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210**

- 1. Ansprüche 1-56 teilweise : papillomavirusähnliche Partikel mit deletierten L1 , ohne deletierten L2 Partikeln , deren Proteine ,Fusions proteine sowie Verfahren zur Bildung und Reinigung dieser Partikel , Proteine und Fusionsproteine .
- 2. Ansprüche 1 ,4-16 ,18 ,20-25 ,27 ,30-56 teilweise papillomavirusähnliche Partikel mit deletierten L2 , ohne deletierten L1 Partikeln , deren Proteine ,Fusions proteine sowie Verfahren zur Bildung und Reinigung dieser Partikel , Proteine und Fusionsproteine .
- 3. Ansprüche 1-56 teilweise : papillomavirusähnliche Partikel mit deletierten L1 und deletierten L2 Partikeln , deren Proteine ,Fusions proteine sowie Verfahren zur Bildung und Reinigung dieser Partikel , Proteine und Fusionsproteine .

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03974

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|---------|----------------------------|
| WO-A-9420137 | 15-09-94 | AU-B- | 6443694 | 26-09-94 |
| | | EP-A- | 0688227 | 27-12-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9300436 | 07-01-93 | AU-B- | 662910 | 21-09-95 |
| | | AU-B- | 1985992 | 25-01-93 |
| | | EP-A- | 0592480 | 20-04-94 |
| | | JP-T- | 6508988 | 13-10-94 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9302184 | 04-02-93 | AU-B- | 651727 | 28-07-94 |
| | | EP-A- | 0595935 | 11-05-94 |
| | | JP-T- | 7505042 | 08-06-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| EP-A-0565794 | 20-10-93 | AU-B- | 2462392 | 18-11-93 |
| | | AU-B- | 4076393 | 18-11-93 |
| | | WO-A- | 9320840 | 28-10-93 |
| | | WO-A- | 9321332 | 28-10-93 |
| | | JP-T- | 7505412 | 15-06-95 |
| | | NZ-A- | 244126 | 22-12-94 |
| | | ZA-A- | 9206340 | 21-02-94 |
| | | ZA-A- | 9302624 | 25-10-93 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |